

**EDMAR MARTENDAL**

**APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO E BOX-BEHNKEN PARA OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO COM MICROGOTA PARA DETERMINAÇÃO DE TRICLOROANISOL E TRIBROMOANISOL DE AMOSTRAS DE VINHO POR CROMATOGRAFIA A GÁS.**

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL

Fevereiro 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO E BOX-  
BEHNKEN PARA OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO COM MICROGOTA PARA  
DETERMINAÇÃO DE TRICLOROANISOL E TRIBROMOANISOL DE  
AMOSTRAS DE VINHO POR CROMATOGRAFIA A GÁS.**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química,  
Departamento de Química,  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito para a obtenção do grau de Mestrado em Química.

Aluno: Edmar Martendal  
Orientador: Eduardo Carasek da Rocha

Florianópolis, Fevereiro 2007

**EDMAR MARTENDAL**

**APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO E BOX-BEHNKEN PARA OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO COM MICROGOTA PARA DETERMINAÇÃO DE TRICLOROANISOL E TRIBROMOANISOL DE AMOSTRAS DE VINHO POR CROMATOGRAFIA A GÁS**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 09 de fevereiro de 2007.

---

**Prof. Dr. Ademir Neves**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

***BANCA EXAMINADORA***

---

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha  
Orientador

---

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

---

Prof. Dr. Dílson Roque Zanette

---

Prof. Dr. Berenice da Silva Junkes

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que me deu paciência e perseverança para a realização deste trabalho até o fim, fazendo que de um momento em diante este trabalho começasse a dar certo.

Aos meus pais, José e Valdete, que me apóiam em cada segundo da minha vida.

Ao meu orientador, prof. Dr. Eduardo Carasek, que mesmo estando fora durante um bom tempo, sempre esteve a disposição, auxiliando na realização de todos os nossos trabalhos.

A todos os meus colegas de laboratório: Janaína, Heloísa, Jefferson, Kalya e Joyce pela amizade, colaboração em todos os trabalhos e pelo clima proporcionado no laboratório sempre propício ao trabalho.

Em especial agradeço à minha grande amiga e colega de laboratório Dilma Budziak, com a qual sempre trabalhei durante esses dois anos, e não fosse ela, com sua vontade de trabalhar e produzir e seu imenso coração, jamais teria terminado este trabalho.

A todos os colegas do laboratório 207, que sempre estiveram a disposição para ajudar.

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Jadir e a Grace, pelo apoio nas funções de secretaria.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Haloanisóis.....	3
1.2. Técnicas de preparação de amostra .....	5
1.2.1. Extração com microgota (SDME).....	6
1.3. Estratégias de otimização .....	11
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo Geral .....	15
2.2. Objetivos específicos .....	15
3. PARTE EXPERIMENTAL .....	16
3.1. Instrumentação .....	16
3.2. Reagentes.....	16
3.3. Procedimento de extração .....	17
3.4. Otimização multivariada.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
4.1. Figuras analíticas de mérito .....	33
4.2. Estudo de interferência da matriz e análise de amostras de vinho tinto e branco.....	34
5. CONCLUSÕES .....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38



## RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido uma metodologia analítica para determinação de 2,4,6-tricloroanisol e 2,4,6-tribromoanisol, os quais proporcionam cheiro de mofo ao vinho. A metodologia desenvolvida baseou-se na extração com microgota de solvente com separação e detecção por cromatografia a gás e detector por captura de elétrons. O solvente extrator utilizado foi 1-octanol, suspenso na ponta de uma microseringa convencional para injeção de líquido. O volume utilizado de solvente extrator foi de dois microlitros, sendo a extração realizada a partir do headspace da amostra. Os parâmetros que afetam a eficiência de extração dos analitos pelo solvente foram otimizados para obtenção da melhor sensibilidade. Para tanto, ferramentas multivariadas foram utilizadas. Inicialmente, um planejamento fatorial fracionário foi utilizado para verificação preliminar dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre a resposta analítica. As variáveis concentração de cloreto de sódio, temperatura de extração, tempo de extração, pH da amostra e tipo de matriz (sintética e uma amostra de vinho tinto seco) foram avaliadas. De acordo com os dados obtidos, as variáveis concentração de NaCl, tempo e temperatura de extração foram significantes e, então, simultaneamente otimizados através do planejamento Box-Behnken. As condições ótimas obtidas foram: 25 minutos de extração a 48°C, 20 mL de amostra em frasco de 40 mL ajustado a pH 5,5 e contendo 2,5 mol L<sup>-1</sup> de NaCl. Através de um estudo de efeito de matriz, concluiu-se que a amostra sintética não representava convenientemente as amostras de vinho tinto. Um estudo de diluição foi realizado, e satisfatórias recuperações entre 70 e 120% foram obtidas para a diluição 14 mL de amostra e 6 mL de água. Para as amostras de vinho branco nenhuma diluição foi necessária. Excelentes limites de detecção de 8 e 6 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente para TCA e TBA, foram obtidos. Precisão satisfatória (RSD<16,7%, n=5) foi obtida a um nível de concentração de 40 ng L<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** extração com microgota; Box-Behnken design; planejamento fatorial fracionado; tricloroanisol; tribromoanisol; preparação de amostra.

## ABSTRACT

In this work an analytical method for determination of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole, which provide a mouldy/musty odour in bottled wines, was developed. The method was based on microdrop solvent extraction and separation and detection by high resolution gas chromatography and electron capture detection. The extracting solvent used was 1-octanol, suspended in the tip of a conventional microsyringe needle used for liquid injection for gas chromatography. The extracting solvent volume was two microliters, and the extraction mode selected was extraction from the sample headspace. Parameters affecting the extraction efficiency of the analytes by solvent were optimized for obtention of the highest sensitivity. Therefore, multivariate tools were used. Firstly, a two-level fractional factorial design including a center point was used to check the main and interaction effects of the selected variables over the analytical response. The variables sodium chloride concentration, extraction temperature, extraction time, sample pH and type of matrix (synthetic and a red dry wine sample) were evaluated. In accordance with the results obtained, the variables NaCl concentration, extraction time and temperature were significant and, therefore, simultaneously optimized through Box-Behnken design. The optimum conditions achieved were: 25 minutes of extraction at 48°C, sample pH of 5,5 and NaCl 2,5 mol L<sup>-1</sup>. The effect of sample matrix was studied, and the results showed that the synthetic sample is not capable to represent suitably the wine red samples. A dilution study was performed, and satisfactory recoveries between 70 and 120% were obtained for the dilution of 14 mL of sample with 6 mL of water. For the white wine samples analyzed, no dilution was necessary. Excellent detection limits of 8 and 6 ng L<sup>-1</sup>, respectively for TCA and TBA were estimated. Satisfactory precision was attained (RSD < 16.7%, n = 5) at a concentration level of 40 ng L<sup>-1</sup>.



## LISTA DE FIGURAS

Figura1. Primeiro aparato, utilizado um capilar de Teflon, para a microextração com solvente. ....	7
Figura 2. Extração com microgota posicionando o solvente na ponta de uma microseringa. ....	8
Figura 3. Aparato para extração quantitativa/seletiva de compostos orgânicos básicos. ....	9
Figura 4. Extração e pré-concentração usando SDME. ....	10
Figura 5. Gráfico de Pareto de efeito padronizado obtido para o planejamento fatorial fracionado. Os efeitos que ultrapassam a linha de $p=0,05$ são estatisticamente significativos sobre a resposta analítica com 95% de confiança. ....	24
Figura 6. Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo em função dos valores experimentalmente observados.....	31
Figura 7. Superfícies de resposta obtidas do planejamento Box-Behnken. ....	32
Figura 8. Recuperações obtidas com diferentes diluições das amostras de vinho tinto. (A) TCA e (B) TBA. ....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz completa de um planejamento $2^3$ com as interações entre as variáveis duas a duas. ....	12
Tabela 2. Matriz do planejamento $2^{3-1}$ e as interações entre as variáveis avaliadas duas a duas. ....	13
Tabela 3. Confundimento entre os efeitos de interação 2x2 e 3x3 no planejamento fatorial $2^{5-1}$ utilizado nesse trabalho. ....	14
Tabela 4. Matriz de um planejamento fatorial completo $2^5$ . ....	19
Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$ . ....	20
Tabela 6. Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial fracionado. ....	21
Tabela 7. Níveis, variáveis e a resposta obtida para o planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$ . ....	23
Tabela 8. Coeficientes da regressão linear, erro padrão dos coeficientes, valores de t e probabilidade estatística p e limites de confiança a $\pm 95\%$ para os coeficientes. ....	25
Tabela 9. Níveis, variáveis e as respostas obtidas para o planejamento Box-Behnken. ....	29
Tabela 10. Coeficientes da regressão, erro padrão dos coeficientes, valor de t e p para 5 graus de liberdade e limite de confiança a $\pm 95\%$ dos coeficientes. ....	30
Tabela 11. Figuras analíticas de mérito obtidas pela metodologia proposta através de extração com microgota a partir do headspace da amostra. ....	34
Tabela 12. Recuperações obtidas para as quatro amostras de vinho branco analisadas. ....	36

## 1. INTRODUÇÃO

A presença, constituição e composição de substâncias voláteis em alimentos têm uma influência substancial em sua qualidade. Para o consumidor, por sua vez, a qualidade organoléptica é igualmente importante e decisiva na hora da compra [1].

Centenas de substâncias químicas são potenciais contaminantes de alimentos através de rotas ambientais ou pela própria deterioração do alimento [2].

Essencialmente um *taint* ou *off-flavour* em um alimento é qualquer aroma que não está normalmente associado com este alimento. É geralmente causado por quantidades em nível de traço de compostos orgânicos voláteis não normalmente presentes em alimentos. Embora os termos *taint* e *off-flavour* sejam algumas vezes usados como sinônimo, agora é comum usar *off-flavour* para descrever um aroma inaceitável o qual se desenvolve dentro do alimento através de ação microbiológica ou química nos componentes do alimento, enquanto *taint* é usado para aromas inaceitáveis que se originam de contaminação externa do alimento.

Contaminação que pode ter sua origem em fontes externas tem causado vários problemas à indústria alimentícia nos últimos anos, com custos que chegam a centena de milhões de dólares. Essas contaminações são geralmente introduzidas nos alimentos por absorção de substâncias químicas do ambiente e podem se originar de fontes como ar, água e embalagens. A exposição a estes compostos pode envolver tanto materiais antes do seu processamento, durante ou após, por empacotamento, distribuição ou estocagem. Esses compostos podem se originar de compostos sintéticos que entram em contato com o alimento ou podem ser produtos de ação microbiológica sobre compostos sintéticos ou naturais [3].

A investigação de componentes em bebidas alcoólicas tem ganhado especial atenção de pesquisadores pela relação apresentada entre os benefícios e os riscos a saúde referente ao seu consumo. Várias são as bebidas investigadas,

como saquê [4], cerveja [5], tequila [6], uísque [7] e de maneira especial diferentes vinhos.

Nos últimos anos um crescente interesse com relação à saúde humana, nutrição e prevenção de doenças têm aumentado a demanda de consumidores por alimentos funcionais, incluindo frutas e seus produtos, tais como vinho [8].

Atenção considerável tem sido direcionada aos hábitos comportamentais humanos que poderiam ser tanto considerados fatores de riscos quanto elementos protetores para o desenvolvimento de patologias crônicas. Em particular, muita atenção tem sido voltada para elucidar o papel da dieta na prevenção de doenças cardiovasculares. Acredita-se que a tão conhecida “dieta do Mediterrâneo” possa prevenir doenças cardiovasculares, como uma consequência do seu alto conteúdo em antioxidantes, que são cruciais para amenizar os efeitos oxidativos que implicam em várias doenças. Similarmente, o consumo moderado de vinho tinto tem sido associado com a diminuição do risco de doenças coronárias [9], pois previnem substâncias de serem convertidas a estados químicos oxidados prejudiciais, incluindo a lipoproteína de baixa densidade (LDL), também conhecido como mau colesterol. Grandemente envolvida na construção da placa arterial, a LDL pode promover doenças coronárias. A redução de LDL e a elevação da lipoproteína de alta densidade (HDL) são fatores que contribuem para a redução de doenças coronárias [10].

Um estudo em regiões da França e Sardenha mostrou também uma relação entre o consumo regular de vinho tinto com o aumento na longevidade da população destas regiões [11]. O vinho tinto representa uma rica fonte de polifenóis como antocianinas (AC), catequinas, proantocianinas (PA), estilbenos e outros fenóis. As antocianinas são flavonóides amplamente distribuídos em frutas e vegetais. Elas proporcionam a cor ao vinho tinto e as cascas das uvas pretas e vermelhas [9].

Vinho tinto foi associado com uma redução de 57 % no risco de desenvolvimento de câncer de pulmão em pessoas que o consomem, quando comparado com pessoas que não possuem esse hábito. Adicionalmente, um estudo mostrou que cada copo diário de vinho tinto reduziu o risco de

desenvolvimento de câncer de pulmão em 13 %. Também foi verificado que o consumo de um copo de vinho tinto todos os dias pode reduzir pela metade o risco de câncer de próstata em homens [12].

Um dos problemas mais críticos apresentados na indústria enológica é o odor desagradável de mofo causado pela rolha deteriorada que afeta entre 0,1 e 10 % dos vinhos engarrafados europeus. Os principais compostos responsáveis por este odor desagradável são os haloanisóis [13].

### **1.1. Haloanisóis**

Acredita-se que a maior fonte de contaminação de vinhos por halocompostos se deve a migração dos mesmos a partir de rolhas contaminadas [14].

A rolha de cortiça, que é manufaturada a partir da casca do sobreiro (*Quercus suber*), é atualmente reconhecida como o melhor material para selar garrafas de vinho. Infelizmente, rolhas de cortiça são responsáveis pela contaminação de 2 a 7% das garrafas produzidas anualmente, causando severas perdas econômicas à indústria vinícola. Tradicionalmente, a contaminação da rolha tem sido relacionada à transferência dos compostos, principalmente de origem microbial, da rolha de cortiça para o vinho. De fato, a rolha é um ecossistema complexo que abriga uma população microbial muito grande que diretamente implicam na produção destes compostos. Embora vários compostos tenham sido relatados a este problema de mau odor, os cloroanisóis e especialmente o 2,4,6-tricloroanisol (TCA) tem sido apontado como o principal agente responsável pela contaminação da rolha. De fato, o TCA tem sido reportado ser o responsável por pelo menos 80 % dos casos de contaminação da rolha [15], e em um estudo Pollnitz e colaboradores [16] reportaram que o TCA foi detectado em 100% dos vinhos contaminados. O papel dos cloroanisóis como agentes contaminantes não é restrito ao vinho, desde que a presença destes compostos está bem documentada em outros gêneros alimentícios, como ovos e

aves domésticas [17], frangos [18], frutas secas [19], cafés brasileiros [20] e água potável [21].

Acredita-se também, que fungos isolados de adegas, rolhas e barris podem biossintetizar o TCA junto com outros cloroanisóis como mecanismo de desintoxicação. Este processo levaria a remoção de clorofenóis derivados de reações entre produtos da degradação da lignina e compostos clorados, como soluções cloradas usadas para clareamento da rolha e lavagem dos barris, biocidas clorados usados em florestas de carvalho e conservantes de madeira [13].

Fungos encontrados no chão de *containers* são capazes de metilar o 2,4,6-triclorofenol (TCP) para formar o 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Outros estudos mostraram que a incubação de determinados fungos em meio sintético contendo hipoclorito de sódio produz quantidades consideráveis de TCA [22].

TCA é produzido pela biometilação de TCP por várias bactérias e fungos. TCP foi originalmente usado como fungicida de madeira, mas também é produzido pela cloração da lignina da madeira pelo hipoclorito de cálcio. Tem sido reportado que a fonte de TCA não é limitada a substratos derivados de madeira, mas também incluem embalagens de papel e caixas de papelão. Sua alta taxa de sublimação causa a contaminação de vinho, uísque e vários gêneros alimentícios. Entretanto, nem TCA nem TCP são citotóxicos aos humanos nas baixas concentrações encontradas em bebidas [4].

Recentemente, Chatonnet e colaboradores [23] identificaram que o 2,4,6-tribromoanisol (TBA) também pode ser responsável pelo odor desagradável em vinhos quando quantidades insuficientes de cloroanisóis foram detectadas. A presença de TBA em vinhos pode ser devida à manufatura inapropriada da rolha, mas pode ser mais provavelmente causada devido a contaminantes na atmosfera da vinícola. Cloro e bromofenóis podem ter a mesma origem química, como águas de descarte tratadas com cloro na presença de íons brometo e traços de fenóis. Em todos os casos, a metilação por fungos de halofenóis a haloanisóis é requerida [23].

O fungo xenofílico *Paecilomyces variotii* pode converter quantitativamente o fungicida 2,4,6-tribromofenol (TBP) no metabólito odoroso 2,4,6-tribromoanisol (TBA); depois de 6 semanas a conversão é completa. O TBP é prontamente formado em água contendo cloro e bromo. Industrialmente, derivados sintéticos de bromofenóis, em particular o TBP, foram amplamente recomendados como agente anti-chamas em laminados com resinas e fungicidas em geral para uso em couros, têxteis, tintas, plásticos, polpa celulósica e papel [24].

Estes compostos que causam mau odor estão presentes em concentrações extremamente baixas e também possuem odor limite muito baixo o que torna a sua análise um desafio real tanto para vinho quanto para rolhas [23].

## **1.2. Técnicas de preparação de amostra**

Muitos métodos para a análise de cloroanisóis e clorofenóis são baseados em técnicas cromatográficas [13]. Como técnica analítica ela depende da qualidade da etapa de preparo da amostra, pois quase nenhuma matriz pode ser diretamente injetada num cromatógrafo a gás. Este é o caso típico de análise de matrizes de origem ambiental, que via de regra contém além de particulados não voláteis, termodegradáveis, etc, água em quantidades incompatíveis com as colunas cromatográficas e detectores de CG [25].

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível. A meta final é a obtenção de uma sub-fração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise [26].

Vários procedimentos têm sido propostos para a extração de haloanisóis como extração líquido-líquido (LLE) [27], extração em fase sólida (SPE) [28], extração com soxhlet, extração assistida por ultrassom [29] e extração com fluido supercrítico [30]. Estas técnicas apresentam algumas desvantagens como a pré-concentração de impurezas do solvente juntamente com a amostra, implicando na necessidade do uso de solventes ultrapuros e economicamente inviáveis; volumes

relativamente grandes de amostras e de solventes são requeridos, gerando problemas de descartes, além de que alguns solventes orgânicos podem ter uma elevada toxicidade.

Desta maneira, técnicas livres ou que empregam pequenas quantidades de solventes orgânicos, têm sido apresentadas como alternativas para minimizar os impactos causados pelo uso de solventes orgânicos. Estas técnicas envolvem principalmente a microextração em fase sólida (SPME) [31, 32], extração usando barras magnéticas (SBSE) [33], pervaporação (PV) [34] e extração com microgota (SDME). Como a extração com microgota foi utilizada neste trabalho, esta será tratada com maiores detalhes.

#### *1.2.1. Extração com microgota (SDME)*

A extração com microgota foi primeiramente apresentada por Jeannot e Cantwell [35] em 1996. Nesse primeiro trabalho, a técnica foi denominada microextração com solvente com uma simples gota (do inglês *Solvent microextraction into a single drop*). Neste referido trabalho, a técnica é introduzida, e é demonstrada sua viabilidade como técnica analítica através da extração de um composto modelo, 4-metilacetofenona, de uma amostra aquosa utilizando como solvente extrator n-octano. Em um pequeno capilar de Teflon foram acomodados oito microlitros de n-octano. Este foi então colocado em contato com a solução amostra sob agitação. Após um certo período de extração, a fase orgânica foi amostrada por uma microseringa convencional para injeção de líquidos e diretamente injetada no cromatógrafo a gás. Parâmetros termodinâmicos como a constante de distribuição entre o solvente extrator e o analito da amostra foram calculados, demonstrando a sensibilidade da técnica. Parâmetros cinéticos foram obtidos em função da velocidade de agitação da amostra, como a constante de velocidade para a cinética de transferência de massa, espessura da camada estática de difusão na fase aquosa, coeficientes de transferência de massa e coeficientes de difusão. A Figura 1 ilustra o primeiro aparato de microextração com solvente.



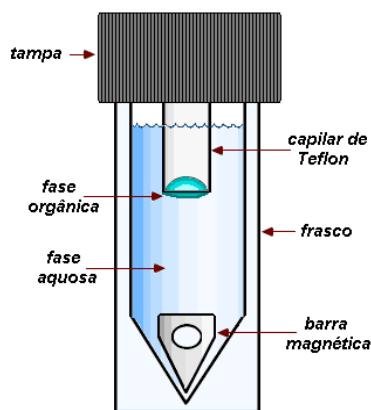


Figura 1. Primeiro aparato, utilizando um capilar de Teflon, para a microextração com solvente.

No ano seguinte, em 1997, Jeannot e Cantwell [36] modificaram a forma de expor a gota de solvente extrator à amostra. Desta vez, o solvente foi exposto à amostra diretamente através de uma microseringa. Um microlitro de solvente extrator (n-octano) foi suspenso na ponta da microseringa e imerso na amostra agitada a diferentes velocidades. Novamente a constante de distribuição foi obtida, desta vez para quatro compostos modelos: 4-metilacetofenona, 4-nitrotolueno, progesterona e malation. Parâmetros cinéticos também foram obtidos, indicando que com esse modo de extração a constante de velocidade é cerca de três vezes maior para 4-metilacetofenona. Na Figura 2, o modo de extração realizado diretamente na solução amostra utilizando uma microseringa convencional é ilustrado.

Também em 1997, os mesmos autores demonstraram a viabilidade da extração com microgota a partir da ponta da microseringa como uma ferramenta na análise de especiação, através da determinação de progesterona livre e associada a uma solução de proteína (albumina sérica bovina) [37].

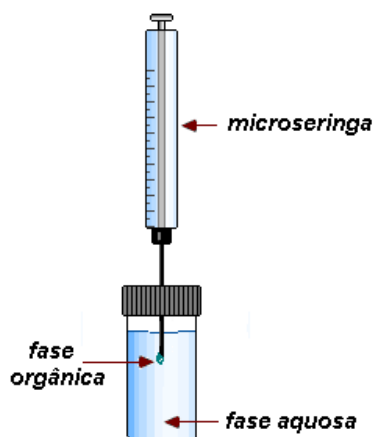


Figura 2. Extração com microgota posicionando o solvente na ponta de uma microseringa.

Em 1998, Ma e Cantwell [38] utilizaram a técnica para extração quantitativa de dois compostos modelo ionizáveis básicos: mefenitina e 2-feniletilamina, porém agora para análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Um mililitro da solução amostra foi tamponado a pH 13 (fazendo assim com que os analitos estivessem em sua forma eletricamente neutra) e um pequeno anel de Teflon foi colocado em contato com a amostra, no qual 80 microlitros de n-octano foram adicionados (ver Figura 3). Acima dessa membrana orgânica, duzentos microlitros de uma solução aquosa receptora tamponada em pH 2,1 foram adicionadas (nesse pH os analitos estarão positivamente carregados). Dessa forma, a extração torna-se seletiva para compostos ionizáveis básicos, diminuindo interferências. Da mesma forma esta configuração poderia ser invertida para extração seletiva de compostos orgânicos ácidos.

Em 2001, concomitantemente, dois trabalhos foram publicados onde a microgota de solvente foi exposta ao headspace da amostra a partir da ponta da agulha da microseringa convencional para cromatografia a gás. Este processo é similar ao modo de amostragem no headspace utilizado em microextração em fase sólida para compostos de média a alta volatilidade.

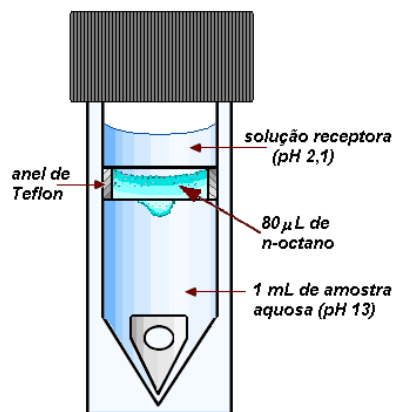


Figura 3. Aparato para extração quantitativa/seletiva de compostos orgânicos básicos.

Theis e colaboradores [39] utilizaram como compostos modelo o benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno. Eles demonstraram a viabilidade da técnica através do cálculo da constante de distribuição, precisão e perfil de extração no tempo. Também foi demonstrada que as etapas que tem influência na transferência de massa da amostra para o solvente extrator (no caso, 1-octanol) foram o grau de convecção na fase aquosa e o grau de convecção no solvente extrator. Já Tankeviciute e colaboradores [40] aplicaram a microextração com solvente no headspace para extração de álcoois de amostras aquosas. Etilenoglicol foi utilizado como solvente extrator e os parâmetros que afetam a eficiência de extração, tais como a velocidade de agitação da amostra, força iônica, temperatura e tempo de extração, foram univariadamente otimizados. A metodologia foi aplicada a amostras de cerveja. A Figura 4 ilustra a seqüência de extração e pré-concentração usando extração com microgota a partir do headspace da amostra.

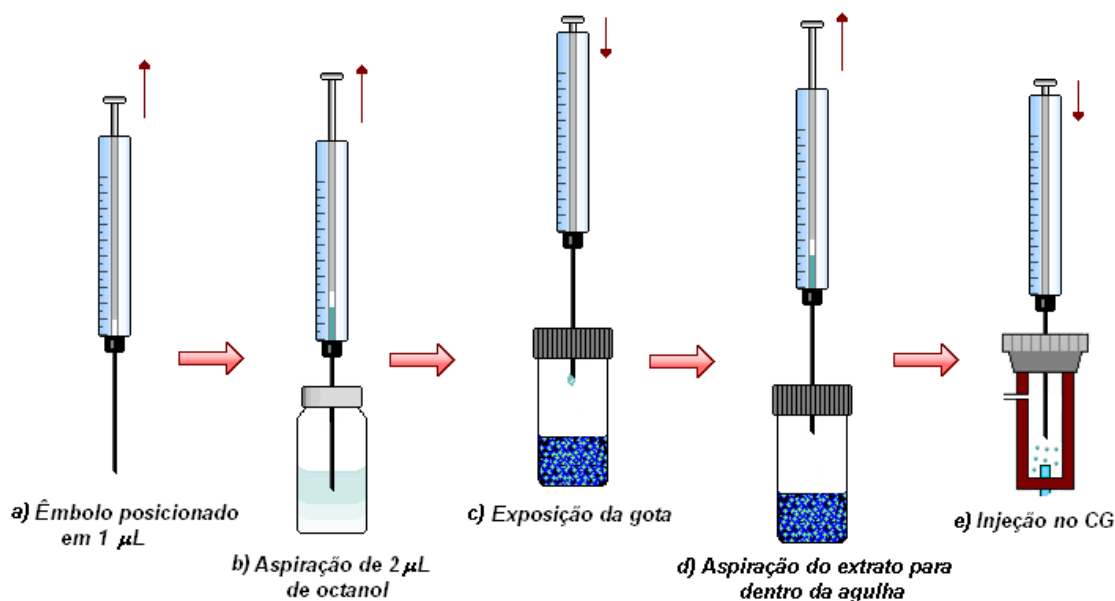


Figura 4. Extração e pré-concentração usando SDME.

A partir de então, a técnica de microextração com solvente ganhou bastante atenção de pesquisadores, sendo que vários trabalhos foram desenvolvidos utilizando os dois modos de amostragem: o solvente extrator exposto diretamente em contato com a amostra ou ao seu headspace. Os dois modos de amostragem têm suas vantagens e desvantagens. A extração direta é mais aplicada para compostos de baixa volatilidade, onde a transferência de massa dos analitos da amostra para seu headspace seria, em princípio, uma etapa mais lenta que a difusão dos analitos no solvente extrator. Já a extração a partir do headspace da amostra é mais aplicada para compostos de média à alta volatilidade, ou seja, a evaporação destes da amostra seria uma etapa rápida no processo de transferência de massa. No caso da extração no modo direto, o solvente extrator pode absorver muitos compostos da matriz da amostra se esta for muito complexa, podendo interferir na separação cromatográfica e/ou na identificação dos compostos. Quando se espera que isso possa acontecer, prefere-se então utilizar a extração a partir do headspace da amostra. Se os compostos alvos forem

de baixa volatilidade, a extração pode se tornar mais demorada, porém o extrato estará mais limpo, acarretando um menor risco de interferência.

Vários artigos tem sido publicados usando esta técnica de preparo de amostra para a determinação de  $\alpha$  and  $\beta$ -endossulfanas, fenóis, herbicidas, inseticidas organofosforados, clorobenzenos e compostos organoestânicos em amostras de água [41-45], pesticidas organofosforados em suco de laranja [46, 47], compostos sulfurados e álcoois em cerveja [48, 49], acetona em sangue [50, 51], aminoácidos em urina [52], entre outros.

### **1.3. Estratégias de otimização**

As metodologias de otimização utilizadas em química analítica são usualmente baseadas em procedimentos univariados. Apesar da interpretação dos resultados obtidos ser simples, as interações entre as variáveis não são detectadas. Conseqüentemente, um falso valor de máximo pode ser obtido, ou seja, certa condição na qual a combinação das variáveis não é a que provê a melhor resposta analítica [53].

Uma das ferramentas multivariadas mais utilizadas é o planejamento fatorial completo em dois níveis. Este é usado para verificar a significância preliminar das variáveis sobre a resposta no sistema em estudo. Neste procedimento, os efeitos principais e de interação das variáveis no intervalo estudado são estimados sendo esta uma das maiores vantagens da otimização multivariada comparada a univariada. Outra vantagem é que o número de experimentos é consideravelmente reduzido, uma vez que somente dois níveis de cada variável são avaliados. Entretanto, se o número de variáveis a serem investigadas se tornar grande, isto também aumentará o número de experimentos. Planejamentos fatoriais fracionados podem ser utilizados nestes casos, onde o número de experimentos é dado por  $2^{k-p} + C$ , onde  $k$  é o número de variáveis,  $C$  é o número de replicatas no ponto central e  $p$  é um número inteiro de indica o quão fracionado será o planejamento experimental. Quando o valor de  $p$  é zero, o planejamento é completo. As variáveis que se mostram estatisticamente significantes podem ser

novamente submetidas a um planejamento experimental, porém agora com uma menor diferença entre os níveis, escolhidas de acordo com os resultados do primeiro planejamento, ou otimizadas através de alguma metodologia de superfície de resposta [54].

As principais informações obtidas de um planejamento fatorial são os efeitos principais das variáveis e os efeitos de interação entre as variáveis avaliadas duas a duas (efeitos de segunda ordem). As interações entre as variáveis avaliadas três a três são de interpretação mais difícil, e, geralmente, tem menor importância frente aos efeitos principais e de segunda ordem. Um exemplo do cálculo dos efeitos (não padronizados) principais e secundários para um planejamento fatorial completo e fracionário em dois níveis com três variáveis é dado abaixo. A matriz completa do planejamento  $2^3$  é representada na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz completa de um planejamento  $2^3$  com as interações entre as variáveis duas a duas.

Ensaio	A	B	C	AB	AC	BC	Resposta
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	$y_1$
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	$y_2$
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	$y_3$
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	$y_4$
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	$y_5$
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	$y_6$
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	$y_7$
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	$y_8$

O valor do efeito principal ou de interação é definido como a média das respostas no nível superior menos a média das respostas no nível inferior, ou seja:

$$\text{Efeito} = 2^*(\sum y^+ - \sum y^-)/n,$$

onde  $y^+$  e  $y^-$  são as respostas para os níveis superior e inferior para os ensaios do planejamento, e  $n$  é o número total de ensaios do planejamento. Para a obtenção dos efeitos de interação das variáveis duas a duas, multiplicam-se os valores codificados das variáveis em linha, obtendo-se uma nova coluna, com novos valores codificados. O valor do efeito então é calculado com a mesma expressão dada acima. Para um planejamento fatorial fracionado  $2^{3-1}$ , a matriz do planejamento bem como das interações entre as variáveis é demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2. Matriz do planejamento  $2^{3-1}$  e as interações entre as variáveis avaliadas duas a duas.

Ensaio	A	B	C	AB	AC	BC
1	-1	-1	+1	+1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1
4	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Através da matriz da Tabela 1, observa-se que todas as colunas são diferentes, ou seja, a combinação entre as variáveis codificadas por coluna são todas diferentes entre si. Já na matriz da Tabela 2, um planejamento fatorial fracionário, observa-se que as colunas se repetem, ou seja, o valor de um dado efeito principal é idêntico a um determinado efeito de interação. Neste exemplo, o efeito de A é igual ao efeito de BC; o efeito de B é igual ao efeito de AC, e o efeito de C é igual ao efeito de AB. Esta igualdade entre efeitos é chamada de confundimento entre efeitos. Quando esse confundimento ocorre entre efeitos principais e de interação dois a dois entre as variáveis, interpretam-se somente os efeitos principais, já que estes geralmente são mais importantes. Perde-se, portanto, as informações sobre os efeitos de interação. Já com um planejamento fatorial completo não há confundimentos, e podem-se avaliar todos os efeitos principais e de interação. Para obtenção das principais informações de um planejamento fatorial, então, é desejável que não haja confundimento entre os

efeitos principais e secundários. Contudo, em situações onde o número de variáveis é muito grande, uma triagem inicial das variáveis pode ser feita através de um planejamento fatorial fracionado saturado, onde, de fato, somente os efeitos principais são avaliados e, posteriormente, as variáveis significativas podem ser submetidas a um planejamento fatorial com maior resolução, ou seja, com nenhum confundimento entre os principais efeitos a serem avaliados [54].

Tabela 3. Confundimento entre os efeitos de interação secundários e terciários no planejamento fatorial  $2^{5-1}$  utilizado nesse trabalho.

Efeito secundário	Efeito terciário
1*2	3*4*5
1*3	2*4*5
1*4	2*3*5
1*5	2*3*4
2*3	1*4*5
2*4	1*3*5
2*5	1*3*4
3*4	1*2*5
3*5	1*2*4
4*5	1*2*3

O confundimento entre os efeitos para o planejamento fatorial fracionário utilizado nesse trabalho não envolve os efeitos principais, como mostra a Tabela 3. Há apenas confundimentos entre os efeitos de interação secundários e terciários entre as variáveis. Portanto, os efeitos principais e secundários puderam ser avaliados independentemente.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Utilizar a técnica de extração com microgota como preparação de amostra para análise cromatográfica e aplicação na determinação de haloanisóis em vinhos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Utilizar a técnica de extração com microgota de solvente a partir do headspace de amostras de vinho tinto e branco para determinação de TCA e TBA utilizando como método de separação a cromatografia a gás de alta resolução e detecção por captura de elétrons.

- Utilizar ferramentas multivariadas como planejamento fatorial fracionado e metodologia de superfície de resposta através do planejamento Box-Behnken para otimização dos parâmetros que afetam a eficiência de extração.

- Validar a metodologia, através da obtenção dos parâmetros analíticos de mérito, como limites de detecção e quantificação, faixa de trabalho, precisão e exatidão.

- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de vinho tinto e branco secos da região da Serra Gaúcha.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Instrumentação**

Todas as análises cromatográficas foram feitas em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14 B, equipado com injetor do tipo split/splitless e detector por captura de elétrons (ECD). Uma coluna capilar OV-5 com 30 metros de comprimento, 0,25 milímetros de diâmetro interno e 0,25 micrômetros de espessura de fase estacionária da OV Specialty Chemical (Marietta, EUA) foi utilizada para a separação cromatográfica. Gás nitrogênio ultrapuro (AGA, São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás carreador e make-up com vazões de 1,0 e 35 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. As temperaturas do injetor e detector foram fixadas em 270 °C e 280 °C, respectivamente. O programa de temperatura do forno da coluna foi: 60 °C (1 min), 20 °C/min até 130 °C, 10 °C/min até 175 °C (1 min), 1 °C/min até 181 °C, 40 °C/min até 280 °C. Banho termostatzado (Nova Técnica, São Paulo, Brasil) e agitador magnético (Speedlab, São Paulo, Brasil) foram utilizados para estabilização da temperatura e agitação das amostras. Uma microseringa convencional de 10 µL da Hamilton (Reno, Nevada, EUA) foi utilizada para o procedimento de extração com microgota.

#### **3.2. Reagentes**

Soluções estoques padrão dos analitos 2,4,6-tricloroanisol (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) e 2,4,6-tribromoanisol (Fluka, Buchs, Suíça) foram preparadas em acetona grau HPLC da Tedia (Fairfield, EUA). Cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado para modificação da força iônica das soluções de trabalho e amostras. O solvente extrator 1-octanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado em todo trabalho. Para preparação da solução sintética de vinho, uma solução contendo etanol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) 11% (v/v), ácido tartárico (Merck, Darmstadt, Alemanha) 0,25% (m/v), ácido láctico 0,30% (m/v) (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) e glicerina 0,60% (m/v) (Nuclear, Diadema, São Paulo) foi

empregada. O pH dessa solução foi ajustado a 3,5 com hidróxido de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

### **3.3. Procedimento de extração**

Antes de cada extração, a microseringa foi rinsada pelo menos 20 vezes com acetona seguido de 10 vezes com o solvente extrator, 1-octanol. Nenhum efeito de memória foi observado com esse procedimento de extração. Após a limpeza da microseringa, o êmbolo foi posicionado na posição de 1  $\mu\text{L}$ , a ponta da microseringa é posta em contato com solvente extrator e dois microlitros são aspirados. A microseringa então perfura o septo do frasco contendo a amostra e a gota de solvente é exposta ao seu headspace, a cerca de 1 cm de distância da amostra. A agitação é então iniciada, juntamente com a contagem do tempo de extração. As amostras foram estabilizadas por 5 minutos na temperatura desejada. As amostras foram agitadas magneticamente, com barra agitadora de dimensões 30 mm de largura por 8 mm de diâmetro, em uma velocidade máxima que não provocasse a desestabilização da barra agitadora. O volume de amostra foi fixado em 20 mL, sempre em frasco de 40 mL, selados com um septo de silicone.

### **3.4. Otimização multivariada**

O objetivo da otimização multivariada foi maximizar a quantidade de analitos extraída pelo solvente extrator, no caso, 1-octanol. Como há relação diretamente proporcional entre a massa extraída e a resposta do detector por captura de elétrons utilizado nesse trabalho, a resposta então otimizada foi a área de pico para os compostos. Como dois compostos (2,4,6-tricloroanisol e 2,4,6-tribromoanisol) foram alvos deste trabalho, para cada corrida cromatográfica duas respostas foram obtidas. Como se deseja otimizar a resposta analítica para os dois compostos simultaneamente, aplicou-se o conceito de função desejabilidade.

Utiliza-se esse tipo de tratamento da resposta obtida quando é desejado otimizar-se mais de uma resposta em um sistema. A desejabilidade é calculada como o produtório das respostas individuais elevado ao inverso do somatório dos expoentes que elevam cada resposta. Esse expoente considera a importância relativa de cada resposta sobre o sistema. Um exemplo para duas respostas a e b, seria:

$$D = (a^m \cdot b^n)^{1/(m+n)}$$

Isto nada mais é que a média geométrica entre dois números. Neste trabalho, a mesma importância foi dada tanto para TCA quanto para TBA, ou seja, os valores de m e n na equação acima foram iguais a um.

Um planejamento fatorial fracionado em dois níveis foi então realizado para avaliação dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre a resposta analítica. As variáveis: concentração de cloreto de sódio, temperatura de extração, tempo de extração, pH da amostra e tipo de matriz foram avaliadas através de 19 experimentos. A matriz do planejamento fracionado  $2^{5-1}$  pode ser facilmente obtida através da modificação da matriz do planejamento fatorial completo  $2^5$ . A Tabela 4 mostra a combinação dos experimentos para um planejamento fatorial completo  $2^5$ .

Tabela 4. Matriz de um planejamento fatorial completo  $2^5$ .

Ensaio nº	Var 1	Var 2	Var 3	Var 4	Var 5
1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	-1
11	-1	+1	-1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	-1
17	-1	-1	-1	-1	+1
18	+1	-1	-1	-1	+1
19	-1	+1	-1	-1	+1
20	+1	+1	-1	-1	+1
21	-1	-1	+1	-1	+1
22	+1	-1	+1	-1	+1
23	-1	+1	+1	-1	+1
24	+1	+1	+1	-1	+1
25	-1	-1	-1	+1	+1
26	+1	-1	-1	+1	+1
27	-1	+1	-1	+1	+1
28	+1	+1	-1	+1	+1
29	-1	-1	+1	+1	+1
30	+1	-1	+1	+1	+1
31	-1	+1	+1	+1	+1
32	+1	+1	+1	+1	+1

Para a construção da matriz do planejamento fracionário  $2^{5-1}$ , a combinação das variáveis codificadas para as variáveis de um a quatro permanece a mesma de um planejamento completo  $2^5$ . Já os valores codificados da variável cinco para cada ensaio são obtidos pela multiplicação dos valores codificados das variáveis de um a quatro, ou seja,  $\text{var1} \cdot \text{var2} \cdot \text{var3} \cdot \text{var4} = \text{var5}$ . A matriz do planejamento fatorial fracionário utilizado nesse trabalho está na Tabela 5.

Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$ .

Ensaio nº	Var 1	Var 2	Var 3	Var 4	Var 5
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1

Um ponto central realizado em triplicata foi incluído no planejamento para estimar a variância experimental e para avaliar a perda de linearidade entre os níveis escolhidos para cada uma das variáveis. Esse procedimento é denominado de checagem de curvatura, onde o software estima se há diferença significativa na

inclinação entre as duas possíveis retas formadas entre o nível inferior e o ponto central e entre o ponto central e o nível superior. Todos os dados obtidos na otimização das condições de extração neste trabalho foram processados pelo software Statistica 6.0. Os valores reais das variáveis nos níveis estudados neste planejamento fatorial fracionado estão resumidos na Tabela 6. A concentração dos analitos foi mantida constante nessa etapa da otimização em 100 ng L<sup>-1</sup>.

Tabela 6. Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial fracionado.

Variáveis	-1	0	+1
Tempo / (min)	10	20	30
pH da amostra	1,5	3,5	5,5
[NaCl] / (mol L <sup>-1</sup> )	0,0	2,7	5,4
Temperatura / (° C)	40,0	52,5	65,0
Tipo de matriz	vinho	vinho/sintética*	sintética

\* 10 mL de vinho e 10 mL de amostra sintética.

As variáveis significativas apontadas pelo gráfico de Pareto, o qual foi obtido após regressão linear múltipla, checagem de curvatura e análise de variância, foram otimizadas através de metodologia de superfície de resposta. A metodologia escolhida foi o planejamento Box-Behnken, que é baseado em um planejamento fatorial fracionado em três níveis. O número de experimentos é dado por  $N = 2k(k-1) + C_0$ , onde  $k$  é o número de variáveis e  $C_0$  o número de replicatas no ponto central. Uma equação quadrática foi gerada, e as condições ótimas puderam ser encontradas através dessa relação matemática.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento fatorial fracionado foi escolhido para a otimização inicial das variáveis devido ao seu reduzido número de experimentos (19, ou seja, 16 mais 3 no ponto central) comparativamente ao planejamento fatorial completo ( $2^5 + 3 = 35$  experimentos).

Os valores investigados para cada variável, tanto quanto as respostas obtidas (calculadas como a média geométrica das áreas de pico para TCA e TBA), estão apresentados na Tabela 7.

Os níveis selecionados para temperatura e tempo de extração levaram em conta um compromisso entre a frequência analítica e a mínima evaporação da microgota de solvente extrator. A combinação extrema entre essas variáveis foi de 30 minutos e 65°C.

O pH da amostra foi estudado mantendo-se o pH médio das amostras de vinho de cerca de 3,5 como ponto central do planejamento e variando duas unidades para baixo e para cima desse valor.

O tipo de matriz foi avaliado de maneira a verificar uma possível interferência que as várias substâncias presentes na amostra de vinho tinto seco possam exercer na atividade dos analitos, comparativamente a matriz sintética.

O intervalo de concentração estudado de cloreto de sódio envolveu a não adição como nível mínimo e 5,4 mol L<sup>-1</sup> como nível máximo.



Tabela 7. Níveis, variáveis e a resposta obtida para o planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$ .

Tempo/min	pH	[NaCl]/mol L <sup>-1</sup>	Temperatura/°C	Matriz	Resposta <sup>a</sup>
10	1,5	0,0	40,0	Sintética	298903
30	1,5	0,0	40,0	Vinho	463157
10	5,5	0,0	40,0	Vinho	313890
30	5,5	0,0	40,0	Sintética	622971
10	1,5	5,4	40,0	Vinho	276625
30	1,5	5,4	40,0	Sintética	1013128
10	5,5	5,4	40,0	Sintética	490925
30	5,5	5,4	40,0	Vinho	712200
10	1,5	0,0	65,0	Vinho	473091
30	1,5	0,0	65,0	Sintética	545702
10	5,5	0,0	65,0	Sintética	492719
30	5,5	0,0	65,0	Vinho	719887
10	1,5	5,4	65,0	Sintética	534864
30	1,5	5,4	65,0	Vinho	119505
10	5,5	5,4	65,0	Vinho	476616
30	5,5	5,4	65,0	Sintética	211551
20	3,5	2,7	52,5	Vinho/Sintét.	574705
20	3,5	2,7	52,5	Vinho/Sintét.	616501
20	3,5	2,7	52,5	Vinho/Sintét.	498815

<sup>a</sup> média geométrica das respostas individuais.

Das respostas apresentadas na Tabela 7, o gráfico de Pareto foi construído e está apresentado na Figura 5.

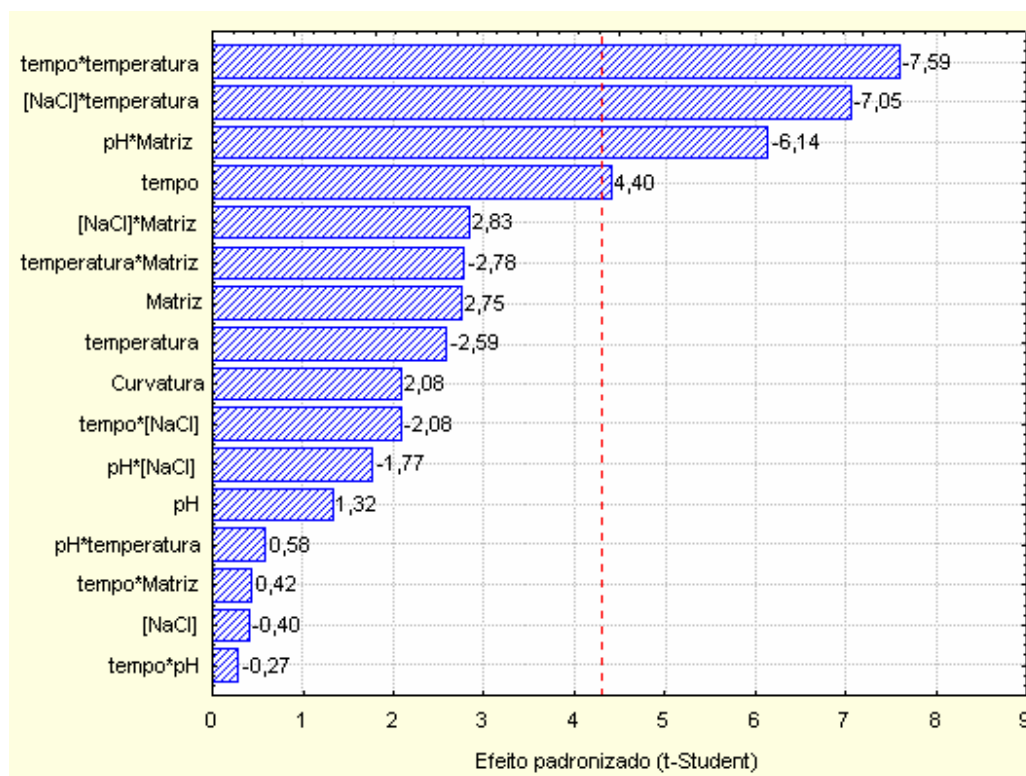


Figura 5. Gráfico de Pareto de efeito padronizado obtido para o planejamento fatorial fracionado. Os efeitos que ultrapassam a linha de  $p=0,05$  são estatisticamente significativos sobre a resposta analítica com 95% de confiança.

A correlação matemática entre a resposta analítica e as variáveis foi realizada por regressão linear e checagem de curvatura. A significância dos efeitos foi realizada por análise de variância a um nível de significância de 95% ( $p=0,05$ ). A Tabela 8 mostra os coeficientes do modelo linear estimados pelo software, bem como o erro padrão dos coeficientes, os respectivos valores de t-Student, os valores de p e os limites de confiança a  $\pm 95\%$  dos valores dos coeficientes da regressão.

Tabela 8. Coeficientes da regressão linear, erro padrão dos coeficientes, valores de t e probabilidade estatística p e limites de confiança a  $\pm 95\%$  para os coeficientes. As linhas em negrito representam os coeficientes estatisticamente significativos com 95% de confiança.

Fatores	Coef. Reg.	Erro padrão	t (2)	p	-95% lim. confiança	+95% lim. confiança
<b>Intercepto</b>	<b>485358</b>	<b>14915</b>	<b>32,54</b>	<b>0,0009</b>	<b>421184</b>	<b>549533</b>
Curv.	77982	37536	2,08	0,1733	-83520	239484
<b>(1)tempo</b>	<b>65654</b>	<b>14915</b>	<b>4,40</b>	<b>0,0479</b>	<b>1480</b>	<b>129829</b>
(2)pH	19736	14915	1,32	0,3168	-44438	83911
(3)[NaCl]	-5932	14915	-0,40	0,7293	-70106	58243
(4)temp.	-38617	14915	-2,59	0,1224	-1E+05	25558
(5) Matriz	40987	14915	2,75	0,1108	-23188	105162
1*2	-4097	14915	-0,27	0,8093	-68271	60078
1*3	-30985	14915	-2,08	0,1734	-95160	33190
<b>1*4</b>	<b>-1E+05</b>	<b>14915</b>	<b>-7,59</b>	<b>0,0169</b>	<b>-2E+05</b>	<b>-49060</b>
1*5	6338	14915	0,42	0,7122	-57836	70513
2*3	-26340	14915	-1,77	0,2194	-90515	37834
2*4	8715	14915	0,58	0,6181	-55460	72889
<b>2*5</b>	<b>-91540</b>	<b>14915</b>	<b>-6,14</b>	<b>0,0255</b>	<b>-2E+05</b>	<b>-27366</b>
<b>3*4</b>	<b>-1E+05</b>	<b>14915</b>	<b>-7,05</b>	<b>0,0195</b>	<b>-2E+05</b>	<b>-41002</b>
3*5	42203	14915	2,83	0,1055	-21971	106378
4*5	-41520	14915	-2,78	0,1085	-1E+05	22655

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para o modelo foi de 0,99051. O valor obtido para t Student com dois graus de liberdade e 95% de confiança foi de 4,3. O número de graus de liberdade é calculado pela diferença entre o número de experimentos realizados no planejamento e o número de coeficientes do modelo matemático ao qual é feita a regressão linear. Para o planejamento proposto, 19 experimentos foram realizados, e 17 coeficientes foram necessários para o modelo, como pode ser visto na Tabela 8, resultando então em 2 graus de

liberdade. O valor de t Student para cada efeito é então calculado pela razão entre o coeficiente do modelo e o erro padrão estimado para o mesmo. Em planejamentos experimentais em dois níveis, o software faz uma estimativa conjunta da variância do sistema, ou seja, o erro padrão estimado é o mesmo para todos os coeficientes do modelo. O valor de t Student calculado que ultrapassa o valor crítico de 4,3 é então considerado estatisticamente significativo sobre a resposta analítica com 95% de confiança.

Com relação aos sinais algébricos dos efeitos, a seguinte interpretação deve ser feita: valores positivos de efeito estimado indicam um aumento na resposta quando a variável segue em direção ao seu nível máximo. Valores negativos indicam maiores respostas em direção ao nível inferior da variável. Para as interações, valores positivos indicam que a resposta aumentará se as duas variáveis forem em direção ao mesmo nível, inferior ou superior. E valores negativos indicam um aumento na resposta se as variáveis forem em direções contrárias, ou seja, uma variável em direção ao nível superior e a outra em direção ao nível inferior.

Do gráfico de Pareto da Figura 5 pode-se observar que o único efeito principal estatisticamente significativo foi o do tempo de extração, apresentando sinal positivo, indicando que, na média, um tempo de extração maior que dez minutos aumenta significativamente a massa extraída dos analitos da amostra para o solvente extrator.

De uma maneira bastante interessante, e que não poderia ser constatado através de uma otimização univariada, observa-se que três interações foram significativas, a saber: tempo e temperatura de extração, concentração de cloreto de sódio e temperatura de extração, e tipo de matriz e pH da amostra.

O efeito negativo da interação entre o pH da amostra e o tipo de matriz (sintética ou de vinho tinto seco) aponta um aumento na resposta quando utilizada a amostra sintética e pH baixo ou a amostra de vinho e pH alto. Este fato indica que conforme a matriz é mudada, também muda a força com a qual os analitos estão ligados a esta, conforme o pH da amostra também é mudado. As outras espécies químicas presentes na amostra de vinho parecem estar menos ligadas

aos analitos quando o pH está no nível superior estudado de 5,5. De fato, simular uma matriz de vinho é uma tarefa complicada, e somente os componentes majoritários foram adicionados. Mesmo assim, uma diferença significativa foi observada no ajuste de pH entre a amostra de vinho e a amostra sintética. Para o ajuste a pH = 1,5 as duas matrizes necessitaram de 1,2 mmol de NaOH (sempre para 20 mL de amostra). Já para o ajuste a pH = 5,5, a amostra sintética necessitou de 0,45 mmol de NaOH, enquanto a amostra de vinho necessitou de 1,2 mmol de NaOH, uma diferença de quase três vezes. De modo a estudar somente a influência do pH, essa diferença de força iônica pela diferença na quantidade adicionada de NaOH para obtenção do pH 5,5 entre as matrizes foi compensada pela adição de 0,75 mmol ( $1,2 \text{ mmol} - 0,45 \text{ mmol}$ ) de solução aquosa de NaCl de mesma concentração de NaOH ( $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) à amostra sintética. Mesmo com essa compensação, verificou-se que a influência é de fato devido ao pH da amostra. Embora não significativo, o efeito da variável tipo de matriz apresentou efeito positivo. Com isso em mente, decidiu-se continuar a otimização com a amostra de vinho em pH = 5,5, de maneira a otimizar as condições de extração na presença das substâncias interferentes que estão levando a uma diminuição do sinal analítico quando trabalhado com a amostra de vinho.

A modificação da força iônica da amostra é um procedimento amplamente utilizado em métodos de extração. O aumento da força iônica da solução amostra (geralmente aquosa) tende a diminuir a solubilidade de analitos orgânicos nesse meio. Assim, a constante de distribuição dos analitos entre a fase extratora e a amostra tende a aumentar, devido ao aumento da concentração dos analitos no headspace da amostra. Isto se deve a uma consequência do aumento da constante da lei de Henry para os analitos, que relaciona a pressão de vapor de equilíbrio de uma substância com sua concentração na fase condensada. Entretanto, uma elevada força iônica altera bruscamente as propriedades físico-químicas da solução, tal como a tensão superficial e a viscosidade da amostra. Este fato pode levar a diminuição da difusibilidade dos analitos na amostra, diminuindo a taxa de transferência de massa dos analitos da fase condensada para o seu headspace.

A temperatura de extração é um parâmetro extremamente importante em qualquer procedimento de extração, pois afeta tanto a velocidade da transferência de massa quanto a posição do equilíbrio de partição. Um aumento na temperatura de extração aumenta a cinética de transferência de massa, diminuindo assim o tempo necessário para que se atinja um equilíbrio de partição entre a amostra e a fase extratora. Contudo, a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) associada ao processo de sorção dos analitos pela fase extratora é negativa. Com isso, um aumento na temperatura de extração leva a uma diminuição na constante de partição, diminuindo assim a massa de analito extraída no equilíbrio. A temperatura então afeta a eficiência de extração de maneira contrária, e geralmente uma temperatura ótima de extração é observada. Os resultados obtidos mostram uma interação negativa entre o tempo de extração e a temperatura de extração. Isto pode ser explicado pelo fato que a evaporação do solvente extrator depende da temperatura e do tempo de exposição da mesma maneira, ou seja, maiores tempos de extração a maiores temperaturas levarão a uma maior evaporação do solvente. O volume de fase extratora é um parâmetro muito importante que afetará a quantidade de analitos extraídos no equilíbrio, aumentando com o aumento do volume de fase extratora. Com isso, em maiores temperaturas há necessidade de menor tempo para extração, caso contrário haverá perda de sensibilidade devido à evaporação do solvente. Por outro lado, em menores temperaturas um maior tempo de extração é necessário.

Baseado nos resultados obtidos, as variáveis tempo de extração, temperatura de extração e concentração de cloreto de sódio foram escolhidas para um estudo mais detalhado através de uma metodologia de superfície de resposta, mais especificamente um planejamento Box-Behnken. Os níveis escolhidos e as respostas obtidas para o planejamento estão resumidos na Tabela 9. O planejamento Box-Behnken é baseado em um planejamento fatorial em três níveis, porém bastante fracionado. O número de experimentos é dado por  $N = 2k(k-1) + C$ , onde  $k$  é o número de variáveis e  $C$  o número de replicatas no ponto central. Este planejamento permite a obtenção de superfícies de respostas modeladas por equações com maior ou menor número de coeficientes, onde

geralmente uma equação quadrática com dez coeficientes do tipo  $f(A,B,C)=A+A^2+B+B^2+C+C^2+AB+AC+BC+K$ , onde K é o intercepto, é utilizada, e os pontos críticos podem então ser calculados.

Tabela 9. Níveis, variáveis e as respostas obtidas para o planejamento Box-Behnken.

Temperatura/°C	[NaCl]/mol L <sup>-1</sup>	Tempo/min	Resposta <sup>a</sup>
40,0	1,5	25	192853
40,0	5,5	25	183188
40,0	3,5	20	153043
40,0	3,5	30	254629
47,5	1,5	20	213222
47,5	5,5	20	133247
47,5	1,5	30	236983
47,5	5,5	30	267394
47,5	3,5	25	244903
47,5	3,5	25	318175
47,5	3,5	25	266655
55,0	1,5	25	265486
55,0	5,5	25	142031
55,0	3,5	20	227424
55,0	3,5	30	104077

<sup>a</sup> média geométrica das áreas de pico para TCA e TBA.

Três superfícies são obtidas dos resultados do planejamento Box-Behnken. Elas estão demonstradas na Figura 7. Os coeficientes da equação que correlacionam as três variáveis e a resposta analítica, a estimativa de erro para cada coeficiente, os valores de t-Student e da probabilidade estatística p encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Coeficientes da regressão, erro padrão dos coeficientes, valor de t e p para 5 graus de liberdade e limite de confiança a  $\pm 95\%$  dos coeficientes.

Fatores	Coef. Reg.	Erro padrão	T (5)	p	-95% lim. confiança	+95% lim. confiança
Intercepto	-4783708	1317330	-3,63	0,015039	-8170012	-1397404
(T)Temp. (L) <sup>a</sup>	135094	40656	3,32	0,020943	30584	239603
(T)Temp. (Q) <sup>b</sup>	-965	397	-2,43	0,059081	-1985	54
(S)[NaCl] (L)	55848	95184	0,59	0,582867	-188830	300526
(S)[NaCl] (Q)	-6596	5577	-1,18	0,290101	-20933	7741
(t)tempo (L)	139936	52853	2,65	0,045554	4074	275798
(t)tempo (Q)	-1499	892	-1,68	0,153777	-3793	795
T*S	-1896	1429	-1,33	0,241812	-5570	1777
T*t	-1500	572	-2,62	0,046897	-2969	-30
S*t	2760	2143	1,29	0,254289	-2750	8269

<sup>a</sup> (L) termo linear; <sup>b</sup> (Q) termo quadrático.

A equação então é dada por:  $R = -4783718 + 135094(T) - 965(T)^2 + 55849(S) - 6596(S)^2 + 139936(t) - 1499(t)^2 - 1897(T)(S) - 1500(T)(t) + 2760(S)(t)$ , onde, (T) é a temperatura em °C, (S) é a concentração de cloreto de sódio em mol L<sup>-1</sup> and (t) é o tempo de extração em minutos. A equação obtida tem um coeficiente de determinação de 0,82.

O gráfico dos resíduos do modelo está apresentado na Figura 6. Embora o coeficiente de determinação, que correlaciona os valores previstos pelo modelo com os valores observados experimentalmente, não tenha sido muito satisfatório ( $R^2 = 0,82$ ), considera-se que o modelo explica de forma razoável os dados experimentais, visto que a distribuição dos resíduos está bastante aleatória, ou seja, o resíduo não apresenta estrutura. A distribuição aleatória dos resíduos é um requisito necessário para a confirmação se um modelo matemático está adequado aos dados experimentais observados.



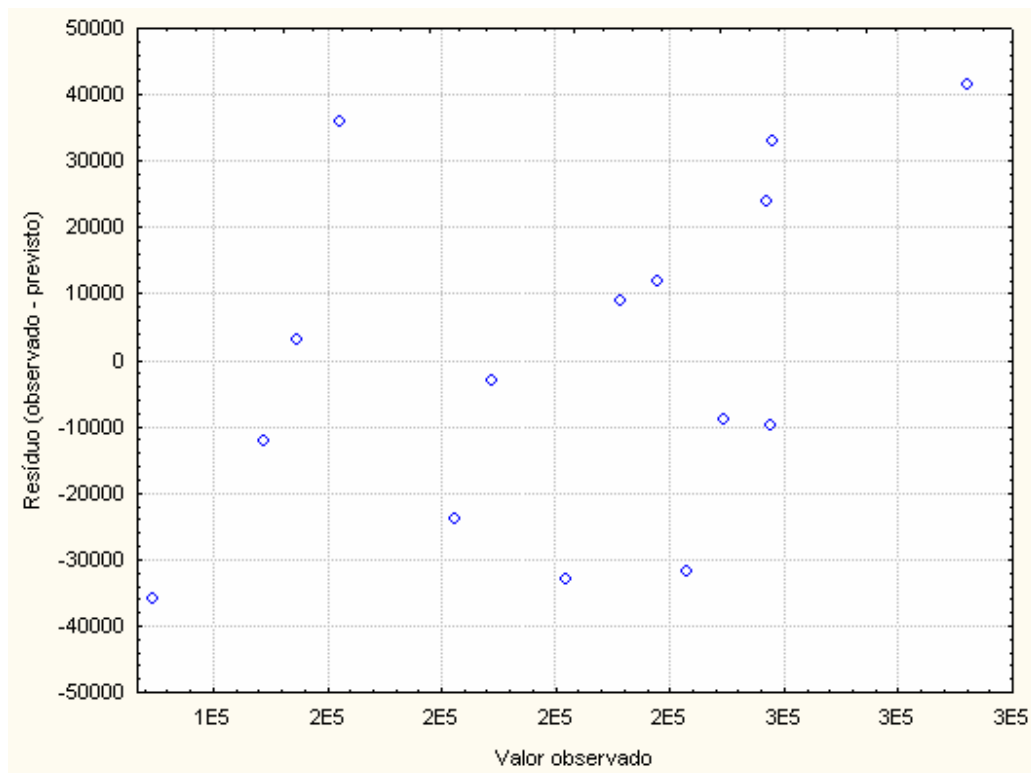


Figura 6. Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo em função dos valores experimentalmente observados.

Os pontos críticos são obtidos pela resolução do sistema de três equações formados pelas derivadas parciais, cada uma igualada a zero, condição para obtenção de pontos críticos.

$$\partial R/\partial(T) = 135094 - 1930(T) - 1897(S) - 1500(t) = 0$$

$$\partial R/\partial(S) = 55849 - 131925(S) - 1897(T) + 2760(t) = 0$$

$$\partial R/\partial(t) = 139936 - 2998(t) - 1500(T) + 2760(S) = 0$$

$$(T) = 48 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ } (S) = 2,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ e } (t) = 25 \text{ min.}$$

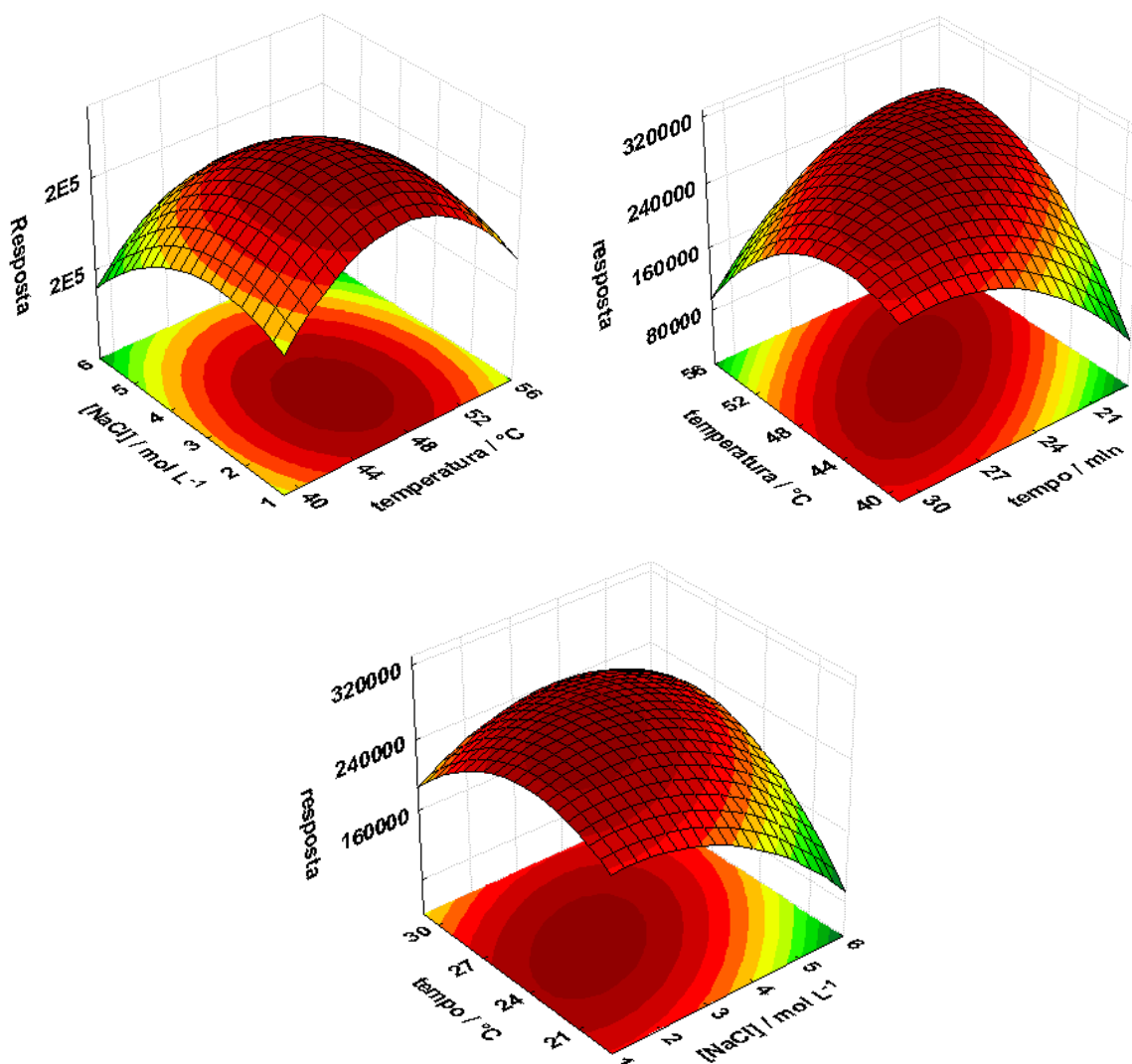


Figura 7. Superfícies de resposta obtidas do planejamento Box-Behnken.

A aplicação do critério de Lagrange indica se um ponto crítico é um ponto de máximo, mínimo ou ponto de sela.

Uma equação quadrática desta forma apresenta somente um ponto crítico, onde os determinantes de Hessian da função podem assumir as seguintes situações:

- Não há nenhuma informação:  $\Delta_2 = 0$ .
- Há um máximo relativo:  $\Delta_1 < 0$ ;  $\Delta_2 > 0$ ;  $\Delta_3 < 0$ .

c) Há um mínimo relativo:  $\Delta_1 > 0$ ;  $\Delta_2 > 0$ ;  $\Delta_3 > 0$ .

d) Há um ponto de sela: quando nenhuma das situações acima ocorrer.

Os determinantes de Hessian de uma função  $H(x, y, z)$  são calculados usando as seguintes expressões:

$$\Delta_3 = \begin{bmatrix} \frac{\delta^2 R}{\delta x^2} & \frac{\delta^2 R}{\delta y \delta x} & \frac{\delta^2 R}{\delta z \delta x} \\ \frac{\delta^2 R}{\delta x \delta y} & \frac{\delta^2 R}{\delta y^2} & \frac{\delta^2 R}{\delta z \delta y} \\ \frac{\delta^2 R}{\delta x \delta z} & \frac{\delta^2 R}{\delta y \delta z} & \frac{\delta^2 R}{\delta z^2} \end{bmatrix}$$

$$\Delta_2 = \begin{bmatrix} \frac{\delta^2 R}{\delta x^2} & \frac{\delta^2 R}{\delta y \delta x} \\ \frac{\delta^2 R}{\delta x \delta y} & \frac{\delta^2 R}{\delta y^2} \end{bmatrix}$$

$$\Delta_1 = \frac{\delta^2 R}{\delta x^2}$$

Aplicando o critério de Lagrange juntamente com o determinante de Hessian para os valores experimentais, obtiveram-se os seguintes valores:  $\Delta_1 = -1930$ ;  $\Delta_2 = 2,2 \times 10^7$  e  $\Delta_3 = -5,4 \times 10^9$ , indicando que o ponto crítico obtido é um máximo relativo, como já poderia ser facilmente constatado através das superfícies de resposta. Com esses resultados, têm-se as condições ótimas de extração: 25 minutos de extração a 48 °C; concentração de cloreto de sódio de 2,5 mol L<sup>-1</sup> e pH da amostra de 5,5.

#### 4.1. Parâmetros analíticos de mérito

Terminada a otimização, as figuras analíticas de mérito foram obtidas, e estão apresentadas na Tabela 11.

Os limites de detecção e quantificação foram avaliados como sendo 3 e 10 vezes, respectivamente, a estimativa do desvio do coeficiente linear dividido pela inclinação da curva de calibração.

Tabela 11. Figuras analíticas de mérito obtidas pela metodologia proposta através de extração com microgota a partir do headspace da amostra.

Analitos	LD <sup>a</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	LQ <sup>b</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	R <sup>c</sup>	RSD <sup>d</sup> (%)	Faixa <sup>e</sup>
TCA	8	27	0,99944	12,4	0 - 1000 ng L <sup>-1</sup>
TBA	6	20	0,99996	16,7	0 - 1000 ng L <sup>-1</sup>

<sup>a</sup>limite de detecção; <sup>b</sup> limite de quantificação; <sup>c</sup> coeficiente de correlação; <sup>d</sup> desvio padrão relativo; <sup>e</sup> intervalo de concentração estudado.

De acordo com Alzaga e colaboradores [32], a concentração de TCA que considera-se produzir um defeito em vinho está na faixa de 10 a 40 ng L<sup>-1</sup>. Portanto, os limites de detecção obtidos com a metodologia proposta são adequados para detecção dos analitos neste nível de concentração. Excelentes coeficientes de correlação foram obtidos,  $R > 0,9994$ . A precisão, calculada como desvio padrão relativo de cinco medidas seqüenciais a 40 ng L<sup>-1</sup>, apresentou valores menores que 16,7%. Apesar de serem consideradas precisões razoáveis aquelas com desvios padrões relativos menores que 10%, os valores obtidos são considerados adequados, visto que a metodologia está sendo aplicada a análise de traços, em nível de concentração muito baixo, na ordem de ng L<sup>-1</sup>.

#### 4.2. Estudo de interferência da matriz e análise de amostras de vinho tinto e branco

Com as condições otimizadas, duas curvas analíticas foram construídas, uma com a amostra sintética de vinho e outra com a mesma amostra de vinho tinto utilizada para a otimização. As inclinações foram então comparadas. A relação entre a inclinação da curva feita na amostra de vinho dividido pela inclinação da curva feita na amostra sintética multiplicado por 100 fornece então a porcentagem de recuperação. Recuperações de 63 e 69% foram obtidas, respectivamente para TCA e TBA. Este é um indicativo que somente os componentes majoritários utilizados na preparação da amostra sintética não estão

sendo suficientemente representativos da amostra de vinho tinto, ou seja, os outros componentes da matriz da amostra estão interferindo na liberação dos analitos de forma mais pronunciada do que na amostra sintética.

De modo a superar esse problema e proceder à quantificação através de calibração externa, ou seja, utilizando como padrões de calibração a solução sintética, um estudo de diluição da amostra foi realizado.

Sabe-se que interferência da matriz pode ser minimizada ou superada pela diluição da amostra, ao custo, é claro, de alguma perda de sensibilidade, mais ou menos pronunciada dependendo do fator de diluição utilizado. Através da curva de calibração com a matriz sintética, estimaram-se os limites de detecção. Excelentes limites de detecção de  $8 \text{ ng L}^{-1}$  para TCA e  $6 \text{ ng L}^{-1}$  para TBA foram obtidos. Assim, uma diluição da amostra não prejudicaria significativamente a sensibilidade da metodologia desenvolvida.

Três fatores de diluição foram testados: nenhuma diluição, ou seja, 20 mL de amostra; 17 mL de amostra e 3 mL de água; e, por fim, 14 mL de amostra e 6 mL de água. A concentração de TCA e TBA nas amostras de vinho tinto foi fixada em  $100 \text{ ng L}^{-1}$ . Os resultados do estudo de diluição para as amostras de vinho tinto estão na Figura 8, na forma de um gráfico relacionando porcentagem de recuperação em função das três diluições estudadas para as cinco amostras. Observa-se uma tendência de aumento na recuperação dos analitos conforme o aumento da diluição, como já esperado. Considerou-se o melhor fator de diluição aquele com 14 mL de amostra e 6 mL de água. Para diluições maiores que esta, a tendência é inverter a situação, ou seja, tornar a amostra de vinho menos complexa que a amostra sintética, aumentando assim em demasia a porcentagem de recuperação. Para as amostras 1, 2 e 3, as recuperações para TBA ficaram entre 100 e 120%, já indicando esse comportamento. Contudo, ainda estão numa faixa de recuperação aceitável. Já para TCA, as recuperações ficaram entre 80 e 100%. Este fator de diluição representa uma diluição de 30%, ou seja, para as amostras de vinho tinto, o limite de detecção passa a ser  $11,6 \text{ ng L}^{-1}$  para TCA e  $8,7 \text{ ng L}^{-1}$  para TBA.

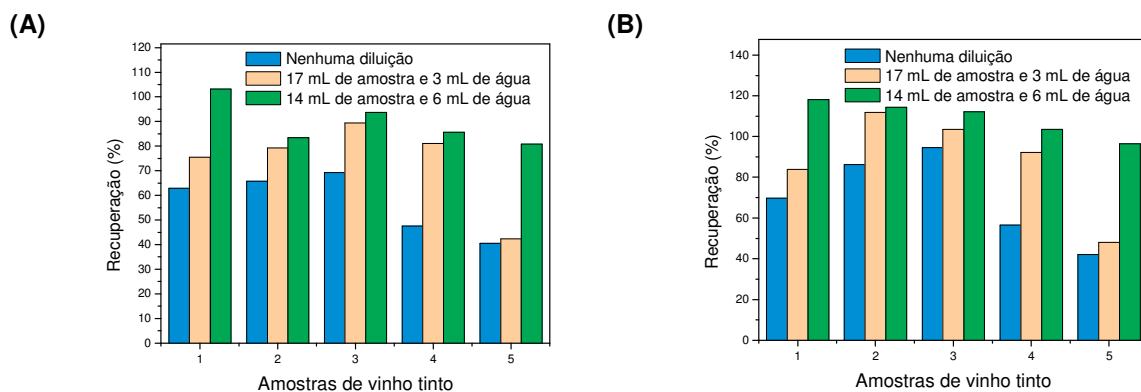


Figura 8. Recuperações obtidas com diferentes diluições das amostras de vinho tinto. (A) TCA e (B) TBA.

A metodologia foi também aplicada para quatro amostras de vinho branco. Duas entre nove das amostras analisadas apresentaram traços dos compostos alvo. Amostra 1 de vinho branco apresentou traços de TCA e a amostra 2 também de vinho branco apresentou traços de TCA e TBA. Entretanto, a concentração encontrada nestas amostras está no intervalo entre o limite de detecção e o limite de quantificação, não podendo assim ser quantificada, apenas detectada.

Tabela 12. Recuperações obtidas para as quatro amostras de vinho branco analisadas.

Vinho branco	Recuperação (%)	
	TCA	TBA
Amostra 1	87.8 ± 1.8	99.5 ± 9.6
Amostra 2	79.2 ± 6.2	97.9 ± 8.9
Amostra 3	87.7 ± 9.3	83.7 ± 6.0
Amostra 4	60.1 ± 4.7	80.4 ± 7.2

Assim, pode-se dizer que as amostras analisadas não teriam problema de rejeição por parte dos consumidores devido ao cheiro proporcionado por estes dois compostos, devido a não detecção destes na maioria dos vinhos analisados.

Um estudo de recuperação foi também realizado para verificar a exatidão da metodologia para as amostras de vinho branco. As amostras foram fortificadas com  $100 \text{ ng L}^{-1}$  dos analitos, sendo as recuperações mostradas na Tabela 12. Com exceção da amostra 4 para TCA, as recuperações são consideradas satisfatórias, levando em conta que nenhuma diluição foi realizada neste caso. Portanto, a amostra sintética pode ser utilizada para calibração, e os limites de detecção continuam os mesmos já citados na Tabela 11.

## 5. CONCLUSÕES

A metodologia analítica proposta neste trabalho mostrou-se sensível o suficiente para detecção dos analitos alvo na faixa de  $9 \text{ a } 12 \text{ ng L}^{-1}$  para vinhos tintos e  $6 \text{ a } 8 \text{ ng L}^{-1}$  para vinhos brancos. Com esses limites de detecção é possível inferir sobre a contaminação de amostras de vinho com TCA e/ou TBA com uma apropriada segurança ( $S/N = 3$ ).

As metodologias empregadas para otimização dos parâmetros que afetam a eficiência de extração, como o planejamento fatorial fracionado e planejamento Box-Behnken, mostraram-se extremamente eficiente, ou seja, o máximo de informação é extraída com a realização de um número mínimo de experimentos. Esse fato torna a otimização multivariada mais econômica e efetiva do que as tradicionais otimizações univariadas, onde um número relativamente maior de experimentos tem que ser realizados para a otimização das mesmas variáveis. Além disso, a obtenção de informações concernentes a interações entre as variáveis torna a otimização multivariada mais confiável que a univariada, com a qual não é possível obter tais informações.

Demonstrou-se que a extração com microgota é uma técnica de preparo de amostra economicamente viável, pois utiliza quantidades ínfimas de solvente orgânico, minimizando também assim a exposição do analista a esses solventes.

A metodologia desenvolvida tem uma sensibilidade comparável a outros métodos citados na literatura para a determinação dos mesmos compostos. Assim, ela representa uma alternativa muito atrativa aos métodos já existentes, pois é economicamente viável, utiliza aparatos extremamente simples, é rápida (apenas 25 minutos de extração), é simples, pois há pouca manipulação da amostra e o condicionamento das mesmas é feito com reagentes simples e encontrados em qualquer laboratório de química (NaCl e NaOH) e a instrumentação é simples, ou seja, foi utilizado um cromatógrafo a gás convencional equipado com detector por captura de elétrons, e nenhuma modificação precisou ser feita para realização do trabalho.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. B. Plutowska W. Wardencki, *Aromagrams - Aromatic profiles in the appreciation of food quality*. Food Chemistry, **101** (2007) 845-872.
2. J. G. Wilkes, E. D. Conte, Y. Kim, M. Holcomb, J. B. Sutherland, D. W. Miller, *Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods*. Journal of Chromatography A, **880** (2000) 3-33.
3. D. S. Mottram, *Chemical tainting of foods*. International Journal of Food Science and Technology, **33** (1998) 19-29.
4. A. Miki, A. Isogai, H. Utsunomiya, H. Iwata, *Identification of 2,4,6-Trichloroanisole (TCA) causing a musty/muddy off-flavor in sake and its production in rice koji and moromi mash*. Journal of Bioscience and Bioengineering, **100** (2005) 178-183.
5. S. Cortacero-Ramirez, A. Segura-Carretero, M. Hernainz-Bermudez de Castro, A. Fernandez-Gutierrez, *Determination of low-molecular-mass organic acids in any type of beer samples by coelectroosmotic capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **1064** (2005) 115-119.



6. A. Pena-Alvarez, S. Capella, R. Juarez, C. Labastida, *Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1134** (2006) 291-297.
7. J. C. R. Demyttenaere, J. I. Sanchez Martinez, R. Verhe, P. Sandra, N. De Kimpe, *Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction*. Journal of Chromatography A, **985** (2003) 221-232.
8. H. P. V. Rupasinghe S. Clegg, *Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources*. Journal of Food Composition and Analysis, **20** (2007) 133-137.
9. M. Dell'Agli, A. Busciana, E. Bosisio, *Vascular effects of wine polyphenols*. Cardiovascular Research, **63** (2004) 593-602.
10. J. F. Tomera, *Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption*. Trends in Food Science & Technology, **10** (1999) 129-138.
11. R. Corder, W. Mullen, N. Q. Khan, S. C. Marks, E. G. Wood, M. J. Carrier, A. Crozier, *Oenology: Red wine procyanidins and vascular health*. Nature, **444** (2006) 566.
12. T. Peregrin, *Wine--A Drink to Your Health?* Journal of the American Dietetic Association, **105** (2005) 1053-1054.
13. C. Pizarro, J. M. Gonzalez-Saiz, N. Perez-del-Notario, *Multiple response optimisation based on desirability functions of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in oak barrel sawdust*. Journal of Chromatography A, **1132** (2006) 8-14.
14. J. L. Gomez-Ariza, T. Garcia-Barrera, F. Lorenzo, A. G. Gonzalez, *Optimisation of a pressurised liquid extraction method for haloanisoles in cork stoppers*. Analytica Chimica Acta, **540** (2005) 17-24.
15. J.-J. R. Coque, M. L. Alvarez-Rodriguez, G. Larriba, *Characterization of an Inducible Chlorophenol O-Methyltransferase from Trichoderma*

- longibrachiatum* Involved in the Formation of Chloroanisoles and Determination of Its Role in Cork Taint of Wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (2003) 5089-5095.
16. A. P. Pollnitz, K. H. Pardon, D. Liacopoulos, G. K. Skouroumounis, M. A. Sefton, *The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and cork*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2** (1996) 184-190.
  17. C. Engel, A. P. de Groot, C. Weurman, *Tetrachloroanisole: A Source of Musty Taste in Eggs and Broilers*. *Science*, **154** (1966) 270-271.
  18. R. F. Curtis, D. G. Land, N. M. Griffiths, M. Gee, D. Robinson, J. L. Peel, C. Dennis, J. M. Gee, *2,3,4,6-Tetrachloroanisole Association with Musty Taint in Chickens and Microbiological Formation*. *Nature*, **235** (1972) 223-224.
  19. K. J. S. T. H. L. N. Frank B. Whitfield, *Simultaneous determination of 2,4,6-trichloroanisole, 2,3,4,6-tetrachloroanisole and pentachloroanisole in foods and packaging materials by high-resolution gas chromatography-multiple ion monitoring-mass spectrometry*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **37** (1986) 85-96.
  20. J. C. Spadone, G. Takeoka, R. Liardon, *Analytical Investigation of Rio Off-Flavor in Green Coffee*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38** (1990) 226-233.
  21. L. Malleret, J. Dugay, A. Bruchet, M.-C. Hennion, *Simultaneous determination of "earthy-musty" odorous haloanisoles and their corresponding halophenols in water samples using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with electron-capture detection*. *Journal of Chromatography A*, **999** (2003) 135-144.
  22. F. B. Whitfield, J. L. Hill, K. J. Shaw, *2,4,6-Tribromoanisole: a Potential Cause of Mustiness in Packaged Food*. *J. Agric. Food Chem.*, **45** (1997) 889-893.
  23. C. Lorenzo, A. Zalacain, G. L. Alonso, M. R. Salinas, *Non-destructive method to determine halophenols and haloanisoles in cork stoppers by*

- headspace sorptive extraction*. Journal of Chromatography A, **1114** (2006) 250-254.
24. I. Rodriguez, M. P. Llompарт, R. Cela, *Solid-phase extraction of phenols*. Journal of Chromatography A, **885** (2000) 291-304.
  25. A. L. P. VALENTE F. AUGUSTO, *Microextração em Fase Sólida*. Química Nova, **23** (2000) 523-530.
  26. S. C. N. Queiroz, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, *Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica*. Química Nova, **24** (2001) 68-76.
  27. H. R. Buser, C. Zanier, H. Tanner, *Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **30** (1982) 359 - 362.
  28. G. J. Soleas, J. Yan, T. Seaver, D. M. Goldberg, *Method for the Gas Chromatographic Assay with Mass Selective Detection of Trichloro Compounds in Corks and Wines Applied To Elucidate the Potential Cause of Cork Taint*. J. Agric. Food Chem., **50** (2002) 1032-1039.
  29. R. Juanola, D. Subira, V. Salvado, J. A. Garcia Regueiro, E. Antico, *Evaluation of an extraction method in the determination of the 2,4,6-trichloroanisole content of tainted cork*. Journal of Chromatography A, **953** (2002) 207-214.
  30. M. K. Taylor, T. M. Young, C. E. Butzke, S. E. Ebeler, *Supercritical Fluid Extraction of 2,4,6-Trichloroanisole from Cork Stoppers*. J. Agric. Food Chem., **48** (2000) 2208-2211.
  31. J. L. Gomez-Ariza, T. Garcia-Barrera, F. Lorenzo, R. Beltran, *Use of multiple headspace solid-phase microextraction and pervaporation for the determination of off-flavours in wine*. Journal of Chromatography A, **1112** (2006) 133-140.
  32. R. Alzaga, L. Ortiz, F. Sanchez-Baeza, M. P. Marco, J. M. Bayona, *Accurate Determination of 2,4,6-Trichloroanisole in Wines at Low Parts Per Trillion by Solid-Phase Microextraction Followed by GC-ECD*. J. Agric. Food Chem., **51** (2003) 3509-3514.

33. J. Marin, A. Zalacain, C. De Miguel, G. L. Alonso, M. R. Salinas, *Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines*. Journal of Chromatography A, **1098** (2005) 1-6.
34. J. L. Gomez-Ariza, T. Garcia-Barrera, F. Lorenzo, *Analysis of anisoles in wines using pervaporation coupled to gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1049** (2004) 147-153.
35. M. A. Jeannot F. F. Cantwell, *Solvent Microextraction into a Single Drop*. Anal. Chem., **68** (1996) 2236-2240.
36. M. A. Jeannot F. F. Cantwell, *Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle*. Anal. Chem., **69** (1997) 235-239.
37. M. A. Jeannot F. F. Cantwell, *Solvent Microextraction as a Speciation Tool: Determination of Free Progesterone in a Protein Solution*. Anal. Chem., **69** (1997) 2935-2940.
38. M. Ma F. F. Cantwell, *Solvent Microextraction with Simultaneous Back-Extraction for Sample Cleanup and Preconcentration: Quantitative Extraction*. Anal. Chem., **70** (1998) 3912-3919.
39. A. L. Theis, A. J. Waldack, S. M. Hansen, M. A. Jeannot, *Headspace Solvent Microextraction*. Anal. Chem., **73** (2001) 5651-5654.
40. A. Tankeviciute, R. Kazlauskas, V. Vickackaite, *Headspace extraction of alcohols into a single drop*. Analyst, **126** (2001) 1674 - 1677.
41. M. C. Lopez-Blanco, S. Blanco-Cid, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gandara, *Application of single-drop microextraction and comparison with solid-phase microextraction and solid-phase extraction for the determination of [alpha]- and [beta]-endosulfan in water samples by gas chromatography-electron-capture detection*. Journal of Chromatography A, **984** (2003) 245-252.
42. M. Saraji M. Bakhshi, *Determination of phenols in water samples by single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and gas chromatography-mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, **1098** (2005) 30-36.

43. E.-c. Zhao, W.-l. Shan, S.-r. Jiang, Y. Liu, Z.-q. Zhou, *Determination of the chloroacetanilide herbicides in waters using single-drop microextraction and gas chromatography*. Microchemical Journal, **83** (2006) 105-110.
44. D. A. Lambropoulou, E. Psillakis, T. A. Albanis, N. Kalogerakis, *Single-drop microextraction for the analysis of organophosphorous insecticides in water*. Analytica Chimica Acta, **516** (2004) 205-211.
45. V. Colombini, C. Bancon-Montigny, L. Yang, P. Maxwell, R. E. Sturgeon, Z. Mester, *Headspace single-drop microextraction for the detection of organotin compounds*. Talanta, **63** (2004) 555-560.
46. E. Zhao, L. Han, S. Jiang, Q. Wang, Z. Zhou, *Application of a single-drop microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in juice*. Journal of Chromatography A, **1114** (2006) 269-273.
47. Q. Xiao, B. Hu, C. Yu, L. Xia, Z. Jiang, *Optimization of a single-drop microextraction procedure for the determination of organophosphorus pesticides in water and fruit juice with gas chromatography-flame photometric detection*. Talanta, **69** (2006) 848-855.
48. Q. Xiao, C. Yu, J. Xing, B. Hu, *Comparison of headspace and direct single-drop microextraction and headspace solid-phase microextraction for the measurement of volatile sulfur compounds in beer and beverage by gas chromatography with flame photometric detection*. Journal of Chromatography A, **1125** (2006) 133-137.
49. M. Saraji, *Dynamic headspace liquid-phase microextraction of alcohols*. Journal of Chromatography A, **1062** (2005) 15-21.
50. N. Li, C. Deng, N. Yao, X. Shen, X. Zhang, *Determination of acetone, hexanal and heptanal in blood samples by derivatization with pentafluorobenzyl hydroxylamine followed by headspace single-drop microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, **540** (2005) 317-323.
51. L. Dong, X. Shen, C. Deng, *Development of gas chromatography-mass spectrometry following headspace single-drop microextraction and simultaneous derivatization for fast determination of the diabetes biomarker*,

- acetone in human blood samples. Analytica Chimica Acta*, **569** (2006) 91-96.
52. Y. C. Fiamegos, C. G. Nanos, C. D. Stalikas, *Ultrasonic-assisted derivatization reaction of amino acids prior to their determination in urine by using single-drop microextraction in conjunction with gas chromatography. Journal of Chromatography B*, **813** (2004) 89-94.
53. M. Preu, D. Guyot, M. Petz, *Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions. Journal of Chromatography A*, **818** (1998) 95-108.
54. R. E. Bruns, I. S. Scarminio, B. d. Barros Neto, *Planejamento e Otimização de Experimentos*. 2<sup>a</sup> ed. Manuais, ed. Unicamp. 1995, Campinas - SP.